



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

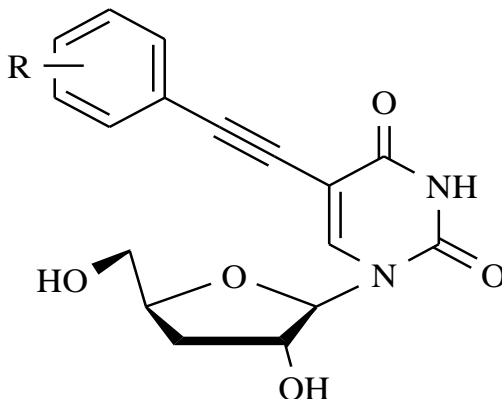
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ
ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΟΥ ΡΑΦΑΕΛΑ-ΜΑΡΙΑ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νέοι τροποποιημένη στη βάση 3'-δέοξυ-φουρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αντιϊικοί και κυτταροτοξικοί παράγοντες. Σύνθεση φασματοκοπική και βιολογική αποτίμηση.

New base-modified 3'-deoxy-furanonucleosides as potential antiviral and cytotoxic agents. Composition of spectroscopic and biological evaluation.



ΛΑΡΙΣΑ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτριο για την εμπιστοσύνη του και τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Επιλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα κ. Κολλάτο Νικόλαο για την βοήθειά του, στην προσπάθεια διεξαγωγής των πειραμάτων, την άψογη συνεργασία και την μεταλαμπάδευση των επιστημονικών του γνώσεων.

Τέλος, δεν μπορώ να μην αναφερθώ σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την θερμή υποδοχή τις πολύτιμες συμβουλές τους, τις όμορφες εμπειρίες και συνεργασίες.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αμούτζιας Γρηγόριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μαρκουλάτος Παναγιώτης — Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Υδατάνθρακες	7
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακτεάλης.....	7
1.3 Νουκλεοζίτες.....	11
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	13
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊκοί παράγοντες.....	15
1.5.1 Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)	16
1.5.2 DDI ή Didanosine	17
1.5.3 DDC ή Zalcitabine	18
1.6 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση.....	19
1.7 Συμπεράσματα.....	23
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
2.1 Σκοπός.....	23
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	24
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)	24
3.2 Χρωματογραφία στήλης	26
3.3 Ξήρανση διαλυτών	27
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	27
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	27
4.1.1 Επισκόπηση της σύνθεσης της (7).....	27
4.1.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης	27
4.2.1 Σύνθεση της 5- <i>O</i> -βενζύουλο-1,2- <i>O</i> -ισοπροπυλιδένιο- α - <i>D</i> -ξυλοφουρανόζης (2).....	29
4.2.2 Σύνθεση της 1,2- <i>O</i> -ισοπροπυλιδένιο-5- <i>O</i> -βενζύουλο-3-δεόξυ- α - <i>D</i> -ριβοφουρανόζης (3).....	30
4.2.3 Σύνθεση της 1,2-δι- <i>O</i> -ακέτυλ-5- <i>O</i> -βενζύουλο-3- <i>C</i> -δεόξυ- β - <i>D</i> -ριβοφουρανόζης (4).....	31
4.2.4 Σύνθεση της 1-(2'- <i>O</i> -ακέτυλ-5- <i>O</i> -βενζύουλο-3- <i>C</i> -δεόξυ- β - <i>D</i> -ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλης (5)	32
4.2.5 Σύνθεση της (6)	33
4.2.6 Σύνθεση της (7)	34

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR	35
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατάνθρακες βρίσκονται σε κάθε ζωντανό οργανισμό στη φύση και αναφέρονται σε μια ευρεία κατηγορία πολύ-υδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, τα οποία όλοι γνωρίζουμε ως σάκχαρα. Οι υδατάνθρακες στην τροποποιημένη τους μορφή αποτελούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων, κάποιοι βρίσκονται στο DNA μεταφέροντας γενετικές πληροφορίες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς περιέχουν σημαντικές ιδιότητες, όπως, αντικαρκινικές, αντιβιοτικές και αντιϊκές. Μια σπουδαία κατηγορία νουκλεοζιτών, είναι αυτών που έχουν δομικά τροποποιημένο τμήμα σακχάρου. Έχουν συντεθεί ενώσεις σαν κι αυτές και έχουν αξιολογηθεί για τις βιολογικές τους λειτουργίες.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αναλύεται ο τρόπος με τον οποίο συνθέτονται νέοι τροποποιημένοι φουρανονουκλεοζίτες στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου και περιγράφονται οι συνθετικές οδοί που έγιναν για την παρασκευή τους. Επίσης, αναλύονται η μέθοδος , τα αποτελέσματα ταυτοποίησης και η βιολογική αποτίμηση.

ABSTRACT

Carbohydrates are found in every living organism in nature and refer to a broad category of polyhydroxylated aldehydes and ketones, all of which we know as sugars. Carbohydrates in their modified form are part of the cell's shell, some are in the DNA carrying genetic information and can be used in pharmaceuticals.

Modified nucleosides are of great research interest as they contain important properties, such as anticancer, antibiotic and antiviral. An important category of nucleosides is those having a structurally modified sugar moiety. Compounds like these have been synthesized and have been evaluated for their biological functions.

This diploma thesis analyzes the way in which new modified furanonucleosides are synthesized in the base and sugar portions and describes the synthetic routes made for their preparation. It also analyzes the method, the identification results and the biological assessment.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.1 Υδατάνθρακες

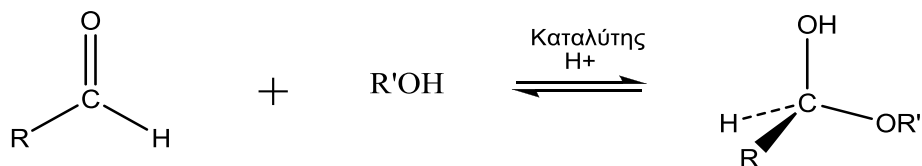
Οι υδατάνθρακες είναι πολύ-υδροξυαλδεΐδες, πολύ-υδροξυκετόνες, ή ενώσεις οι οποίες μπορούν να υδρολυθούν προς αυτές, με γενικό τύπο $(CH_2O)_n$ και βρίσκονται σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Μονοσακχαρίτης λέγεται ο υδατάνθρακας, που δε μπορεί να υδρολυθεί σε απλούστερες ενώσεις, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, ενώ ο υδατάνθρακας, ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς δύο μόρια μονοσακχαρίτη ονομάζεται δίσακχαρίτης (καλαμοσάκχαρο, λακτόζη και μαλτόζη). Ο υδατάνθρακας ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς πολλά μόρια μονοσακχαρίτη καλείται πολυσακχαρίτης (κυτταρίνη, άμυλο, γλυκογόνο).

Επιπλέον, δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη και ενός μικρού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτη, καθώς οι όροι αυτοί χρησιμοποιούνται μόνο για να περιγράψουν ενώσεις, των οποίων το μοριακό βάρος παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο τιμών.

Εκτός του ότι αποτελούν πηγή ενέργειας, δομικά στοιχεία των κυττάρων και άλλων μακρομορίων, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα (ανάγοντες μονοσακχαρίτες, ριβόζη και δεοξυριβόζη), οι τροποποιημένοι υδατάνθρακες συνιστούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων. Κάποιοι απαντούν στα μόρια του DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες και κάποιοι άλλοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

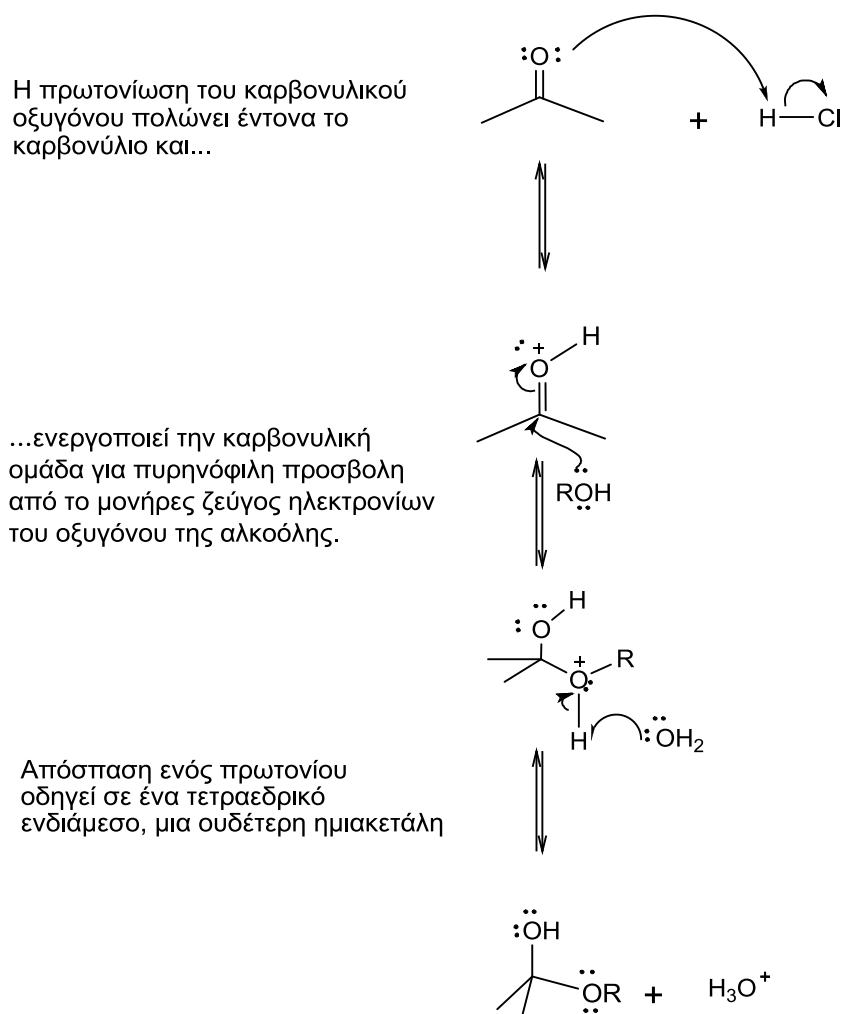
1.2.Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης

Όταν προστίθεται το πυρηνόφιλο μόριο αλκοόλης στην καρβονυλική ομάδα σχηματίζεται μια ημιακετάλη, μια ασταθής ένωση, η οποία είναι και τα δύο, ένας αιθέρας και μία αλκοόλη. (Morisson&Boyd, 1991, p. 758).



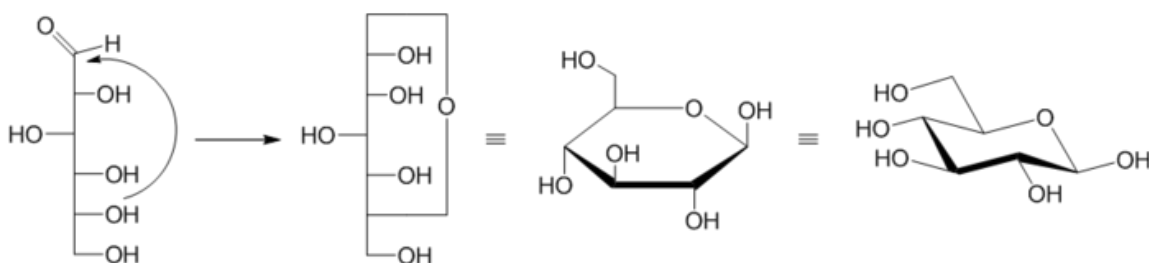
Σχήμα 1 : Σχηματισμός ημιακετάλης

Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 2 (McMurry, 2000, p. 905):

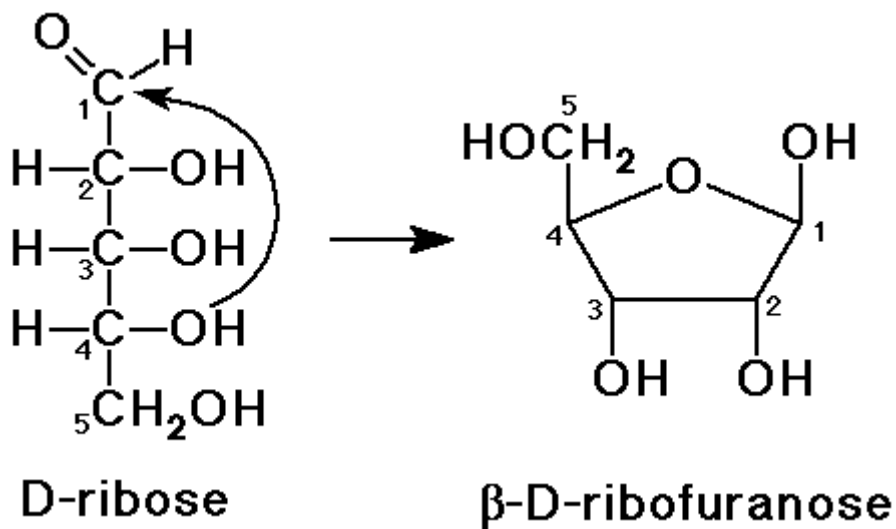


Σχήμα 2: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού ημιακετάλης

Η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη είναι δυνατόν να συμβεί εφόσον, το καρβονύλιο και η υδροξυλομάδα βρίσκονται στο ίδιο μόριο, με συνέπεια το σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες χαρακτηρίζονται αρκετά σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές της κλειστής και ανοικτής αλυσίδας. Παραδείγματος χάρη, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα βρίσκεται με τη δομή εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1 (σχήμα 2). Απεναντίας η φρουκτόζη, απαντά κατά 80% στην πυρανοζική δομή και κατά 20% στη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2 (σχήμα 3).



Σχήμα 3 : Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



Σχήμα 4: Σχηματισμός φουρανόζης

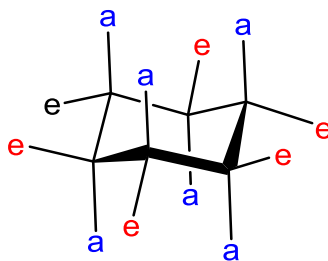
Με την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας, ένας μονοσακχαρίτης αποκτά τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, όπου σχηματίζεται ένα νέο

στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικό κέντρο (McMurry, 2000, p. 1249). Για παράδειγμα, στη γλυκόζη με την αντιστρεπτή της κυκλοποίηση προκύπτουν δύο δομές, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (σχήμα 2). Στην περίπτωση της α-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «α» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη $-CH_2OH$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της β-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «β» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη $-CH_2OH$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου).

Στη φρουκτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια ονοματολογία για τα δυο της ανωμερή α και β, με τη διαφορά ότι αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2, που είναι και ανωμερής.

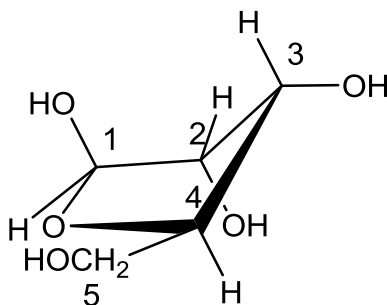
Οι προηγούμενες δομές (Haworth) μπορεί να είναι εύχρηστες, όμως δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι εφικτό να είναι επίπεδος, εξαιτίας της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντιθέτως, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να λάβουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (McMurry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (σχήμα 4). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχετικά κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχετικά παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζονται στερεοχημικά μεταξύ τους, όταν ξεπροβάλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντιθέτως, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Με αυτόν τον

τρόπο, ένας υποκαταστάτης χαρακτηρίζεται με περισσότερη σταθερότητα στην ισημερινή απ' όση στην αξονική θέση.



Σχήμα 5: Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης (**e** = ισημερινός υποκαταστάτης, **a** = αξονικός υποκαταστάτης)

Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (σχήμα 5). Αυτή η διαμόρφωση ονομάζεται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται πολύ γρήγορα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, πράγμα που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 1995).



Σχήμα 6: Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.3.Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, ως δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένης σε ένα σάκχαρο. Οι τέσσερις νουκλεοζιτικές μονάδες του DNA λέγονται δεοξυαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη,

δεοξυθυμιδίνη και δεοξυκυτιδίνη. Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε γίνεται λόγος για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Η διαμόρφωση αυτού του νουκλεοζιτικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer, 1995).

Ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των αντικαρκινικών, αντιϊκών, αντιβακτηριδιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robins *et al.* 1990, MacCoss *et al.* 1990). Ως εκ τούτου, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί εξονυχιστικά το φάσμα των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

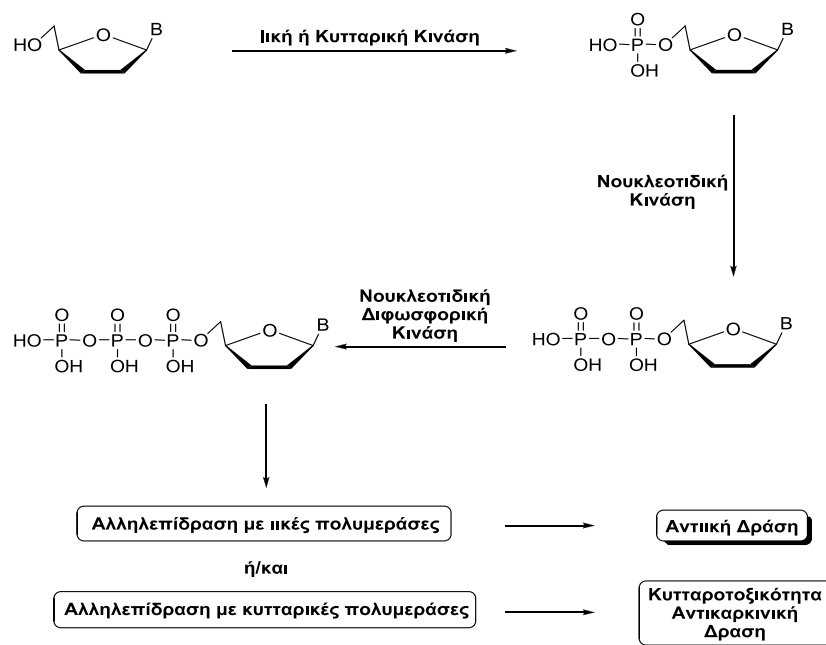
Μέχρι σήμερα έχουν γίνει έρευνες με σκοπό να δημιουργηθούν αντιϊκά και αντικαρκινικά φάρμακα, που αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη με β-απεικόνιση. Τα νουκλεοτίδια, δηλαδή οι φωσφορυλιωμένες αλδοπεντόζες, ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακρές αλυσίδες, οι οποίες απαρτίζουν τα νουκλεϊνικά οξέα, δηλαδή το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Τα νουκλεϊνικά οξέα ανακαλύφθηκαν στα μέσα του 19^{ου} αιώνα από τον Friedrich Miescher. Παρ' όλα αυτά, μεσολάβησαν σχεδόν εκατό χρόνια μέχρι να γίνει γνωστό ότι στα μόρια του DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες, που προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη, την διαίρεσή του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των πρωτεϊνών που είναι αναγκαίες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

1.4.Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Συνοπτικά, ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα φάρμακα βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας διάυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, ή νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων με αντιϊκή ή αντικαρκινική δράση, τα οποία εξαιτίας της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία αρκετών ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών στην πραγματικότητα αποτελούν ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν για να πραγματοποιηθεί η δράση τους. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA (σχήμα 6).

Ένας κοινός μηχανισμός αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005). Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου



Σχήμα 7: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες

νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια, τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

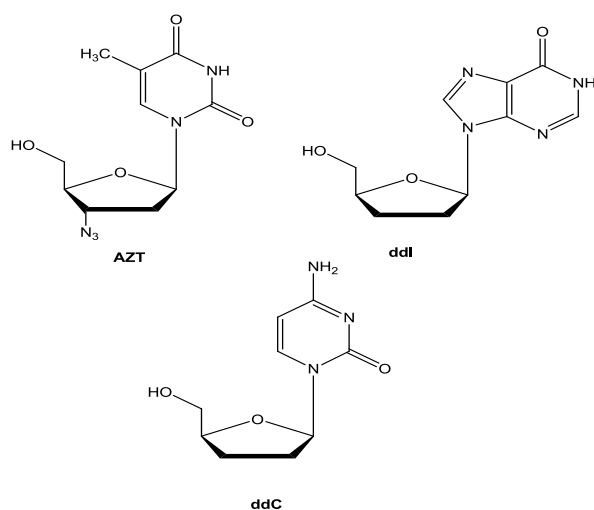
Εκτός από τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev *et al.* 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn *et al.* 2000).

1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊκοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβάλλονται στην σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Με αυτόν τον τρόπο παρέχουν αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιϊκών φαρμάκων (Komiotis D. *et al*, 2008, Zhou W. *et al*, 2004, Perigaund C. *et al*, 1993). Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, στηρίζεται στην ικανότητά αλληλεπίδρασης με τις ιϊκές πολυμεράσες. Οι αντιϊκοί νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη βάση στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV), τον ιό του έρπη ζωστήρα (VZV), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) και C (HCV).

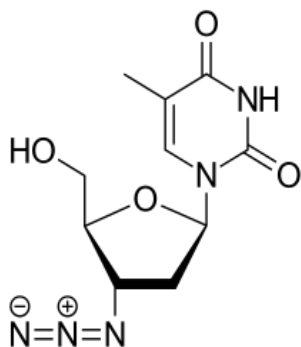
Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (DDI) και το zalcitabine (DDC), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV (σχήμα 7). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα νουκλεοσιδικά αυτά ανάλογα διαθέτουν ως σάκχαρο μία πεντόζη.



Σχήμα 8: Χημικές δομές των AZT, ddi, ddC

1.5.1 Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

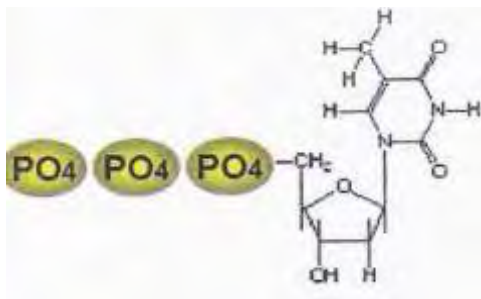
Το Zidovudine ή AZT. Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS¹. Είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης δηλαδή του ενζύμου που χρησιμοποιούν οι ιοί και συγκεκριμένα οι ρετροϊοί για να συνθέσουν DNA και να πολλαπλασιαστούν. Με αποτέλεσμα να αποτελεί έναν τύπο αντιρετροϊκού φαρμάκου. Είναι ανάλογο της



Σχήμα 9: Η χημική δομή του AZT

θυμιδίνης και χορηγείται για την θεραπεία του AIDS δηλαδή της μόλυνσης από τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1).

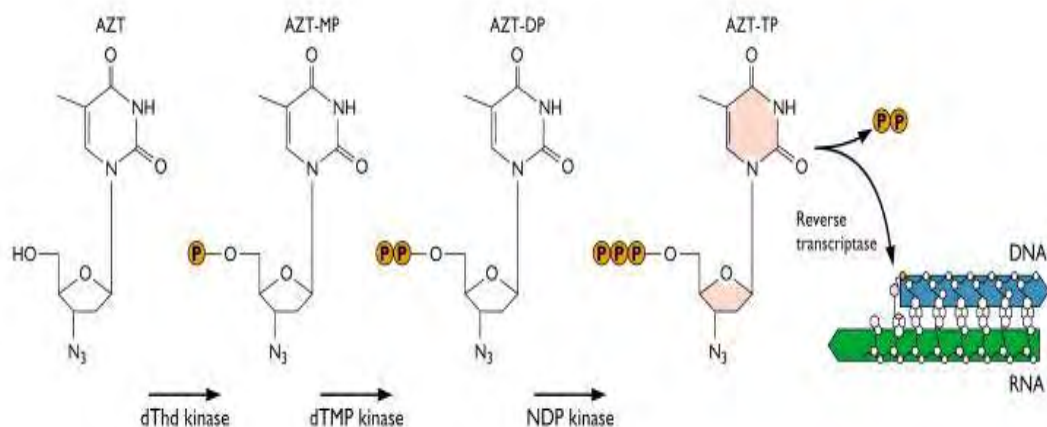
Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'-θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σαν αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Hirogukietal. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιϊκό RNA. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA. Τα συγκεκριμένα ανάλογα νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιϊκού DNA. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή 5'-τριφωσφορικού άλατος (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Στη θυμιδίνη προστίθενται τρεις φωσφορικές ομάδες. Η πρώτη φωσφορυλίωση γίνεται από το ιϊκό ένζυμο και οι υπόλοιπες από τα κυτταρικά ένζυμα. ⁽¹³⁾

Έτσι, φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 11). Επειδή έχει την αζιδο-ομάδα αντί για την

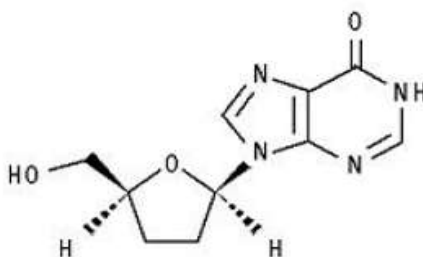
υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



Σχήμα 11: Τερματισμός της αλυσίδας του ιϊκού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

1.5.2 DDI ή Didanosine

Το DDI είναι ένα συνθετικό πουρινικό νουκλεοσιδικό ανάλογο δραστικό ενάντια στον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Η δράση του είναι παρόμοια με τη δράση του AZT στο να παρεμποδίζει την λειτουργία της ιϊκής αντίστροφης μεταγραφάσης.

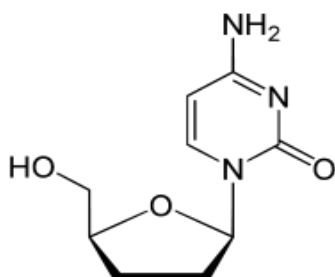


¹www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/

Σχήμα 12: Η χημική δομή του DDI

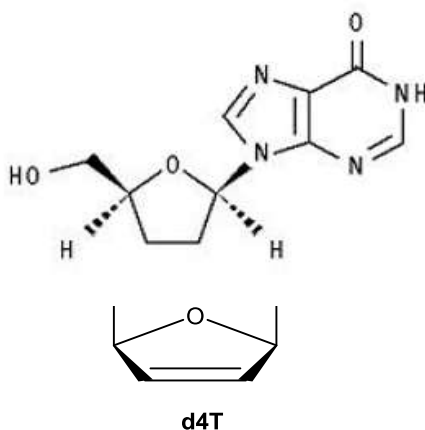
1.5.3 DDC ή Zalcitabine

Το DDC ή αλλιώς διδεοξυκυτιδίνη έχει παρόμοια δράση με το AZT και το DDI δηλαδή χρησιμοποιείται ως αντιρετροϊκό φάρμακο.



Σχήμα 13: Η χημική δομή του DDC

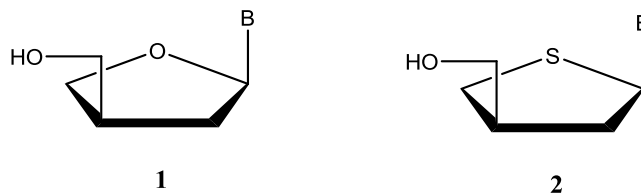
Το συνθετικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στους 2',3'-ακόρεστους νουκλεοζίτες, όπου η 3'-δεοξυ-2',3'-διδεϋδροθυμιδίνη (d4T) δρα επίσης σαν αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης στην θεραπεία κατά του AIDS (Brossetteetal. 2001). Η χημική δομή του d4T απεικονίζεται στο σχήμα 14.



Σχήμα 14: Χημική δομή της D4T

Στην κατηγορία των αντιϊκών ενώσεων συναντάμε και μη κλασικές κατηγορίες νουκλεοζιτών. Μια χαρακτηριστική ομάδα είναι οι απιο-

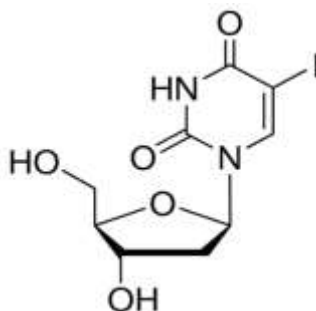
διδεοξυνουκλεοζίτες 1, όπου η 4'-υδροξυμεθυλο ομάδα έχει μετατοπιστεί στον C-3' (Moon *et al.* 2002). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντιϊκή δράση, ενώ αντικαθιστώντας την θέση του οξυγόνου με ένα άτομο θείου, έχουμε τους αντίστοιχους θειο- απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες (σχήμα 15).



Σχήμα 15: Θειο-, απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες

1.6 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση

Ο πρώτος κλινικά αποτελεσματικός νουκλεοζίτης που εγκρίθηκε ήταν η 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη (Σχήμα 16) στις αρχές του 1960, του οποίου η σύνθεση ήταν μέρος ενός αντικαρκινικού προγράμματος (W. H. Prusoff, 1959).

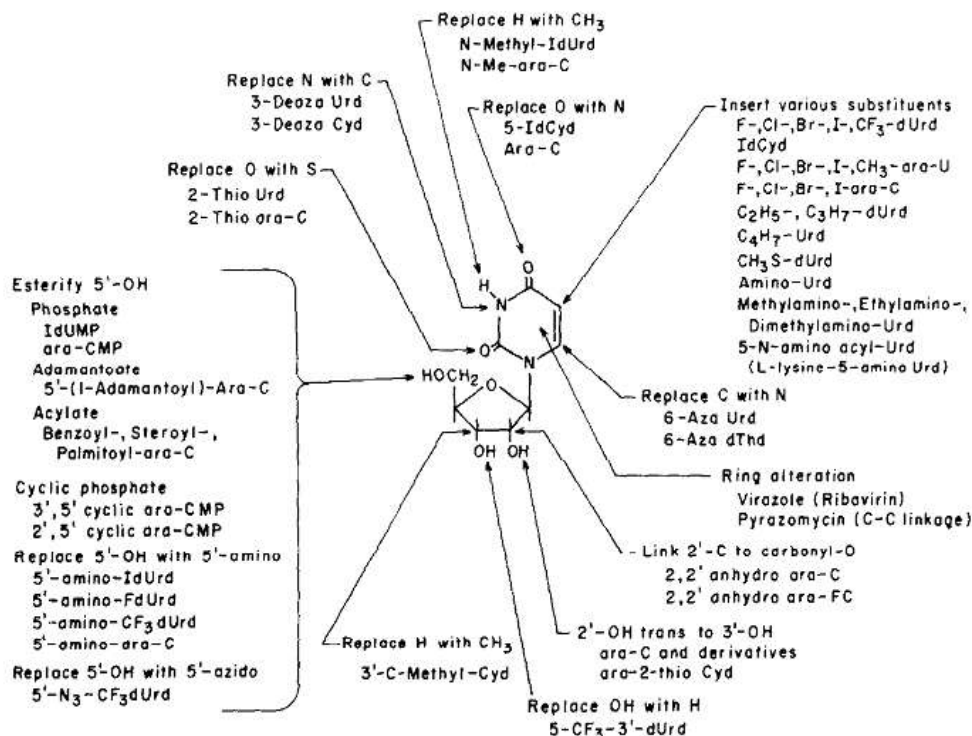


Σχήμα 16: Χημική δομή της 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνης

Οι Johnsons και John (T. B. Johnson and C. O. Johns, 1905-06) είχαν αναφέρει τη σύνθεση 5'-ιώδοπυριμιδινών το 1905. Το 1945, οι Hitchings *et al.* (G. H. Hitchings *et al.*, 1945) ξεκίνησαν συστηματική μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Σύντομα, μία ομάδα (R. L. Thompson *et al.*, 1949) τεκμηρίωσε την μέτρια αναστολή από την 5-βρωμοουρακίλη, την 5-υδροξυουρακίλη και τη 2,4-διθυοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι Visser *et al.* (Visser *et al.*, 1952) ανέφεραν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-δίαζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ και 5-άμινο) ανέστηλαν τον

πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού.

Ένα παράδειγμα που αναπαριστά όλους τους τύπους τροποποίησης που αποδίδει νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση φαίνεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17: Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

5-ΐωδο-2΄-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη)

Οι χημικές, βιοχημικές και κλινικές δοκιμές της IdUrd έχουν ήδη αναφερθεί στο παρελθόν (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η σημαντικότητα του IdUrd έγκειται στο ότι μπορεί να αναπτυχθεί ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο το οποίο θα είναι κλινικά αποτελεσματικό όταν γίνεται μία μόλυνση από έναν ιό. Η IDU είχε περιγραφεί ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της ερπητικής κερατίτιδας από τους Kaufman *et al.* [6-9]. Η αποτελεσματικότητα της Ιδοξουριδίνης στη θεραπεία του απλού έρπη του επιθηλίου του κερατοειδούς στον άνθρωπο, μία ασθένεια που αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης λόγω της μόλυνσης του κερατοειδούς στις ΗΠΑ, έχει αποδειχθεί και εγκριθεί από τον FDA. Ο Juel-Jensen (B. E. Juel-Jensen, 1974, B. E. Juel-

Jensen, 1973), έχει ήδη αναλύσει την κλινική χρησιμότητα της Ιδοξουριδίνης και πολλών άλλων αντιϊκών παραγόντων στον άνθρωπο.

Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης της IdUrd σχετίζεται με τις δυσμενείς βιολογικές επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του αναλόγου της θυμιδίνης σε ιϊκό DNA (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η ενσωμάτωση της IdUrd στο DNA φυσιολογικών μη μολυσμένων κυττάρων, ενδεχομένως είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα που έχει βρεθεί κατά τη διάρκεια είτε της τοπικής είτε της συστηματικής θεραπείας. Η συστηματική τοξικότητα είναι δόσοεξαρτώμενη και όταν εισάγεται καθημερινά στον άνθρωπο σε συγκέντρωση περίπου 100mg/kg για 5 ή 6 ημέρες, μπορεί να παρατηρηθεί στοματίτιδα, λευκοπενία και αλωπεκία (P. Calabresi *et al.*, 1961).

Μαζί με αυτά τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα, υπάρχουν και άλλες ανησυχίες των οποίων η σημασία για τον άνθρωπο είναι δύσκολο να αξιολογηθεί και περιλαμβάνουν την ικανότητα της IdUrd να: 1) επάγει τον σχηματισμό ιών σε καλλιέργεια κυττάρων, 2) να αυξήσει το ρυθμό μετάλλαξης των βακτηρίων, 3) να δημιουργήσει χρωμοσωμικές βλάβες και, 4) να επηρεάσει την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση (W. H. Prusoff and B. Goz, 1975).

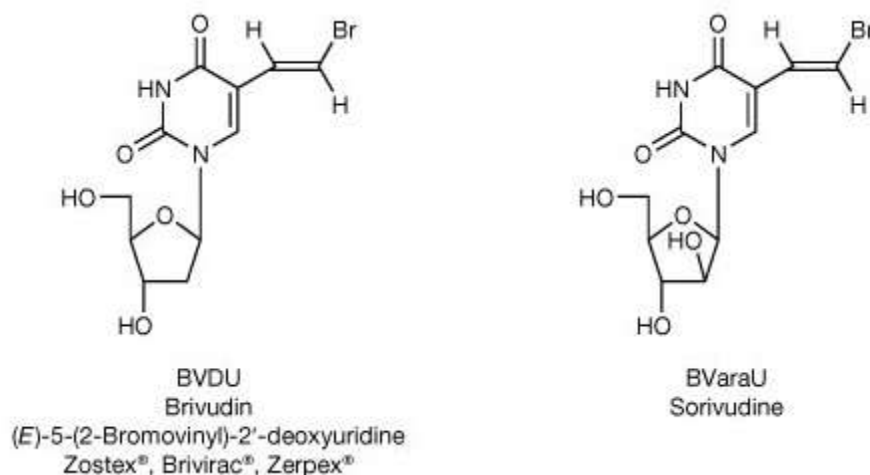
Έτσι, η IdUrd δείχνει να είναι η πρώτη ένωση που παρουσιάζει επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο.

Μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) από τον Prusoff (Prusoff, 1959), το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες ως πιθανά αντιϊκά παράγωγα έχει αυξηθεί (Prusoff & Fischer, 1979). Τα ακόρεστα 5-υποκατεστημένα παράγωγα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5- (2-βρωμοβινυλ) -2'-δεοξουριδίνη] έχει αναδειχθεί ένας από τους πιο ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της αντιγραφής του ιού του έρπη, ιδιαίτερα του ιού απλού έρπη τύπου-1 (HSV-1) (De Clercq *et al.*, 1979). Μεγάλο μέρος του BVDU και σχετικών ενώσεων φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα της HSV-1 κινάσης της θυμιδίνης (TK) να δεχτεί τέτοια ανάλογα ως υποστρώματα, σε αντίθεση με την ανικανότητα του αντίστοιχου ενζύμου ξενιστή (Cheng *et al.*, 1981). Επιπλέον, η τριφωσφορική BVDU αναστέλλει την HSV-1 DNA

πολυμεράση πιο αποτελεσματικά από ό,τι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες (Allaudeen *et al.*, 1981).

Παράδειγμα τροποποίησης στη βάση

Η IDU μπορεί να θεωρηθεί ως το σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διαφόρων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το πιο σημαντικό παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη (Brivudin/BDU), το οποίο αποδείχτηκε πολύ καλός ειδικός αναστολέας του HSV-1, καθώς επίσης και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV) [11,12]. Αργότερα, το ομόλογο του BVDU, η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-*E*-5-(2-βρωμοβίνυλο)ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε ότι είναι εξίσου ισχυρή, αν όχι και περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV [10].



Σχήμα 18: Οι ενώσεις (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU, με ισχυρή δράση έναντι του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα [13].

Η BV-araU εμφανίζει αντιϊκή δράση και έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν δοκιμάζεται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (Haruhiko M. *et al.* 1991).

1.7 Συμπεράσματα

Το συμπέρασμα είναι ότι υπάρχει ανάγκη για αντιϊκά παράγωγα με σημαντικά μικρότερη τοξικότητα. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά τέτοιων αντιϊκών φαρμάκων πρέπει να είναι: 1) ευκολία παρασκευής (χαμηλό κόστος), 2) καλή διαλυτότητα στην τιμή του φυσιολογικού pH ή κοντά σε αυτή, 3) χημική σταθερότητα σε διάλυμα και σε θέρμανση, 4) μεταβολική σταθερότητα στο κυκλοφορικό σύστημα, 5) επαρκή μη πολικότητα ώστε να αποφευχθούν προβλήματα στην μεταφορά των κυττάρων, 7) όχι ανοσοκαταστολή, 8) μη ενεργοποίηση του ιού, 9) μη τερατογόνος δράση και, 10) μη μεταλλαξιγένεση ή καρκινογένεση.

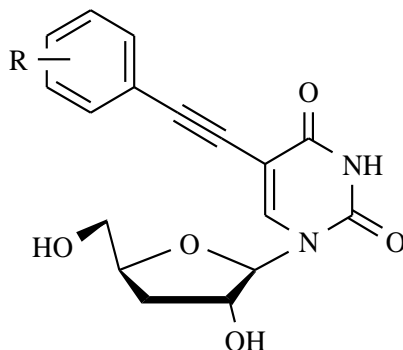
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Η επιστήμη έχει την τάση να εξελίσσεται και να προσπαθεί να ερευνά καινούριες θεραπευτικές ουσίες σημαντικής βιολογικής αξίας με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες, τοξικότητα. Γι' αυτόν το λόγο τεράστια ποικιλία φαρμακευτικών σκευασμάτων υπάρχουν στην αγορά, εξαιτίας της ραγδαίας ανάπτυξης της φαρμακευτικής χημείας, τα οποία σκευάσματα περιέχουν νουκλεοζιτικό ανάλογο ως δραστική ουσία. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία στόχος είναι η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει κυτταροτοξικοί και αντιϊκοί παράγοντες.

Έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις, στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης και στο τμήμα του σακχάρου για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με σημαντικότερη βιολογική δράση. Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια, προέκυψαν νέες τάξεις φούρανο-νουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, όπως οι C5-υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες πυριμιδίνης έχουν ενδιαφέρουσες αντιϊκές και κυτταροτοξικές ιδιότητες.

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με διαφορετικούς υποκαταστάτες και με ετεροκυκλική βάση την ιωδοουρακίλη (σχήμα 19). Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως αντιϊικοί παράγοντες.



Σχήμα 19: Τροποποιημένος στη βάση και στο σάκχαρο φουρανονουκλεοζίτης με υποκαταστάτη: R=2,4,5-CH₃ (c)

3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

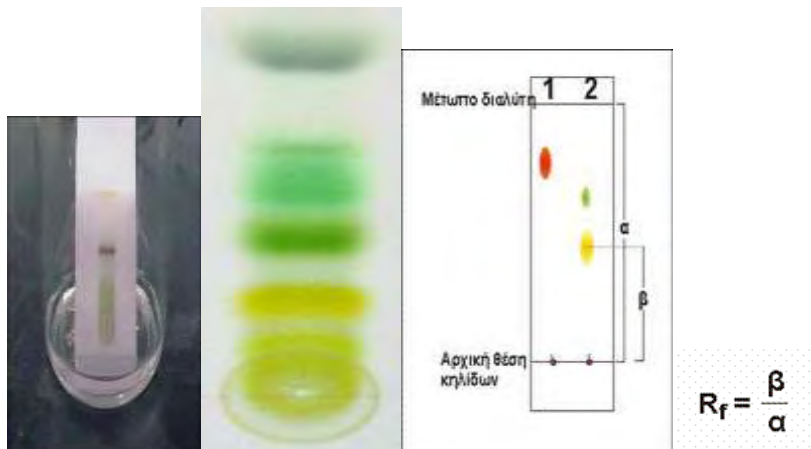
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₄) πάχους 0,2mm.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Στη συνέχεια, ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Έπειτα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί

της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα, ανάλογα με την πολικότητα τους και την χημική συγγένεια που έχουν με την Silica gel και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση την απόσταση που έχει διανύσει το κάθε μόριο στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f . Ο συντελεστής R_f , ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή R_f ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θειϊκού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στο Σχήμα 20.



Σχήμα 20: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Η χρωματογραφία για το πείραμά μας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα συστήματα διαλυτών που ακολουθούν:

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 30/70
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 20/80
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Δ: μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο 10/90

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Η ουσία που απομονώνεται δεν βρίσκεται υπό καθαρή μορφή, οπότε η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό (Silica gel). Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική. Επειδή οι διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη – εκκλούνται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

Η χρωματογραφία στήλης συμβαίνει για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel για ταχύτητα.(240-400, Merckgrade).

3.3 Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, τολουόλιο και μεθανόλη.

Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου και του τολουολίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το

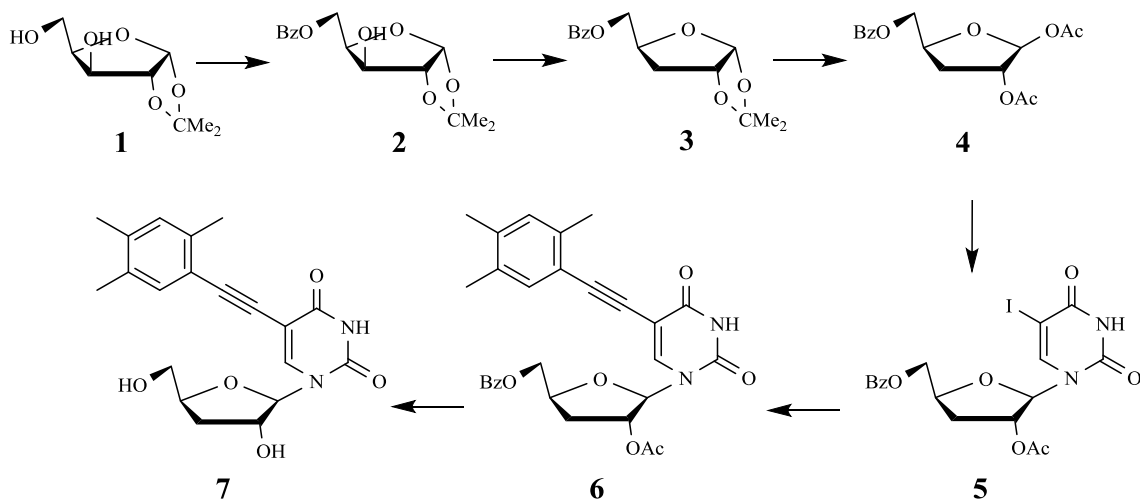
απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μία ώρα.

3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.1 Επισκόπηση της σύνθεσης



4.1.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 5-O-υδρόξυ-1,2-O-ισοπροπυλιδενιο-α-D-ξυλοφουρανοζη (1), η οποία σε διαλύτη CH_2Cl_2 , μετά από εκλεκτική βενζυλίωση της 5-υδρόξυ ομάδας, δίνει τη

δευτεροταγή αλκοόλη 5-O-βενζόυλο-1,2-O-ισοπροπυλιδενιο-α-D-ξυλοφουρανοζη (2). Η αντίδραση προχωράει με καλή απόδοση 80%.

Η επόμενη αντίδραση είναι μία αντίδραση αναγωγής της 2, η οποία γίνεται σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο δημιουργείται ο μέθυλο-οξαλοξικός εστέρας παρουσία μεθυλ-οξαλοξικού χλωρίου σε άνυδρο CH_2Cl_2 και στη συνέχεια, με αντίδραση αναγωγής παρουσία υδριδίου του τριβουτυλοκασσιτέρου (tri-n-butyltin hydrate) σε άνυδρο τολουόλιο λαμβάνουμε την 1,2-O-ισοπροπυλιδένιο-5-O-βενζόυλο-3-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζη (3). Η αντίδραση προχωράει με απόδοση 77%.

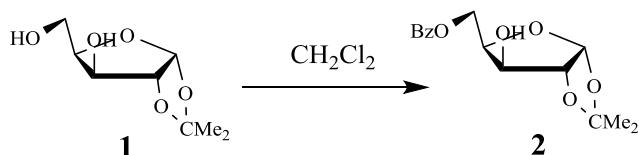
Η σύνθεση συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος 3 με TFA 90%. Στη συνέχεια, παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) σε πυριδίνη, γίνεται ακετυλίωση της ένωσης και λαμβάνουμε το επιθυμητό προϊόν 1,2-δι-O-ακέτυλ-5-O-βενζόυλο-3-C-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζη 4 με απόδοση 85%.

Ακολουθεί σύζευξη με αντίδραση Vorbrüggen [14-17]. Γίνεται η σύζευξη του σακχάρου 4 με τη βάση 5-ιωδοουρακίλη. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση σε άνυδρο ακετονιτριλίου (MeCN), παρουσία εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης στους 100°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, προστίθεται το σάκχαρο 4 και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορο-μεθανοσουλφονικού-τριμεθυλο-σιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) στους 0°C λαμβάνοντας την επιθυμητή 1-(2'-O-ακέτυλ-5'-O-βενζόυλο-3'-C-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (5), σε απόδοση 85%.

Στη συνέχεια, με αντίδραση Sonogashira [18,19] παίρνουμε τον προστατευμένο νουκλεοζίτη 6. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το ακόλουθο. Ο φούρανο-νουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (5) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et_3N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκатаλύτης) και του τετράκισ τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$] (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C , σε απόδοση 69%

Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την αποπροστασία του 6 σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τον τελικό νουκλεοζίτη 7, σε απόδοση 91%.

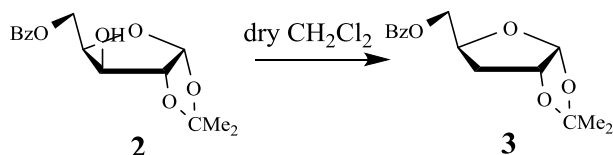
4.2.1 Σύνθεση της 5-O-βενζόυλο-1,2-O-ισοπροπυλιδένιο-α-D-ξυλοφουρανόζης (2)



Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 5-O-υδρόξυ-1,2-O-ισοπροπυλιδένιο-α-D-ξυλοφουρανόζη (1) (2 gr, 10,5 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (20 ml) παρουσία χλωριούχου βενζολίου (1 eq), στους 0oC για 30 λεπτά. Στο προκύπτον μείγμα προστέθηκε H₂O και ακολούθησε εκχύλιση με CH₂Cl₂. Κατόπιν, αφού συλλέχθηκε η οργανική φάση, έγινε ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄, διήθηση και συμπύκνωση, το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε για καθαρισμό σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 30% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Έπειτα, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν 2 (2,47 g) ελήφθη υπό τη μορφή ελαίου.

TLC (Διάλυμα A)	R _f = 0,2
Απόδοση	80%

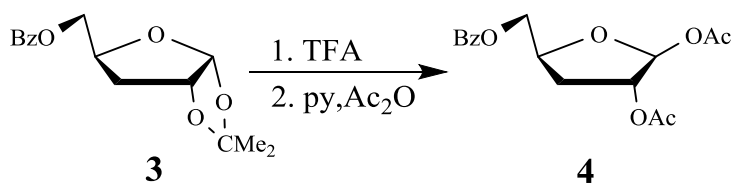
4.2.2 Σύνθεση της 1,2-O-ισοπροπυλιδένιο-5-O-βενζούλο-3-δεόξυ-α-D-ριβοφουρανόζης (3)



Για την σύνθεση της 1,2-O-ισοπροπυλιδένιο-5-O-βενζούλο-3-δεόξυ-α-D-ριβοφουρανόζη, προστέθηκε η (2) (2 eq, 750 mg, 2,55mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (10 ml, $d=1.325 \text{ g/mL}$). Στη συνέχεια, έγινε εκχύλιση του διαλύματος με CH_2Cl_2 και κορεσμένο διάλυμα NaCl και αφού συλλέχθηκε η οργανική φάση, έγινε ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 , διήθηση και τέλος συμπύκνωση. Κατόπιν, στο μίγμα προστέθηκε υδρίδιο του τριβουτυλοκασσιτέρου (tri-n-butyltin hydrate) (2 eq, 783 mg, 2,55 mmol) και άνυδρο τολουόλιο (10 ml) για 1 ώρα. Το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) για καθαρισμό χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 20% οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν 3 (545,5 mg) ελήφθη υπό τη μορφή ελαίου.

TLC (Διάλυμα B)	$R_f = 0,6$
Απόδοση	77%

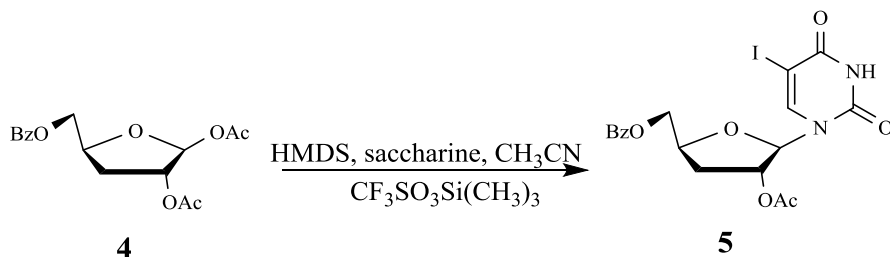
4.2.3. Σύνθεση της 1,2-δι-O-ακέτυλ-5-O-βενζόυλο-3-C-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζης (4)



Η ένωση (3) (270 mg, 0,97 mmol) αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος (TFA) 90% για να γίνει διάνοιξη του ισοπροπυλενιδίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα συμπυκνώθηκε. Αφού απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό, προστέθηκε πυριδίνη (1,6 ml) και οξικός ανυδρίτης (0,7 ml) με σκοπό να γίνει ακετυλίωση της ένωσης και να ληφθεί η (4). Ακολούθησε συμπύκνωση, του προϊόντος και καθαρισμός σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης 20% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν 4 (264,3mg) ελήφθη υπό τη μορφή άχρωμου ελαίου.

TLC (Διάλυμα B)	R _f = 0,4
Απόδοση	85%

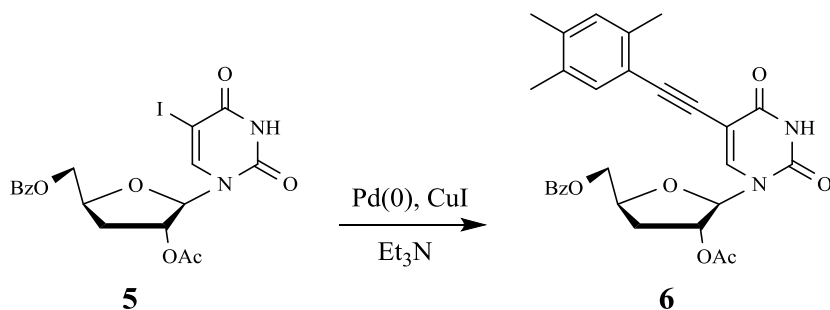
4.2.4 Σύνθεση της 1-(2'-Ο-ακέτυλ-5-Ο-βενζόυλο-3-Ο-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλης (5)



Ένα διάλυμα της 5-ιωδοουρακίλης (1,2 eq, 0,94mmol, 222,75 mg), του HMDS (1,4 eq, 253μL, 1,1 mmol) και της σακχαρίνης (0,046 eq, 7,3mg, 0,04mmol) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (0,24 mmol, 1,6 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για μία ώρα στους 100 °C. Η ολοκλήρωση της συλλιώσης της βάσης γίνεται αντιληπτή όταν το μίγμα γίνει διαυγές. Αφότου το μείγμα έγινε διαυγές, προστέθηκε η 1,2-δι-Ο-ακέτυλ-5-Ο-βενζόυλο-3-Ο-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζη (4) (250 mg, 0,78mmol) καθώς και ο καταλύτης $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (0,20 ml, 1,1 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 30 λεπτά με ψύξη στους 0 °C. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 . Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν 5 (331,7mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού.

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0,25$
Απόδοση	85%
$[\alpha]_D^{22}$	-2
λ_{max}	284 nm

4.2.5 Σύνθεση της (6)



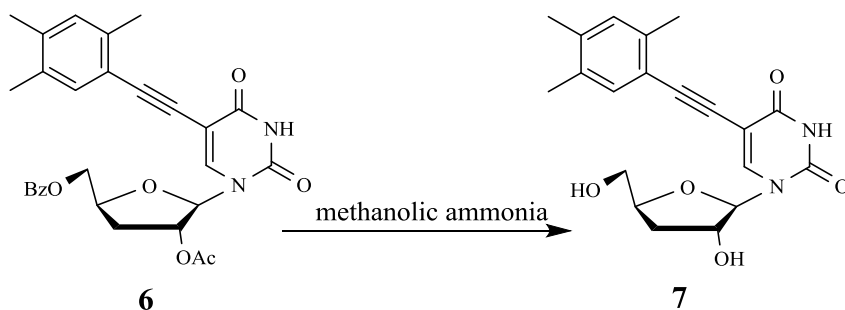
Η σύνθεση του 6 επιτεύχθηκε με τη μέθοδο Sonogashira με χρήση μικροκυμάτων:

Το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF) και η 1-(2'-*O*-ακέτυλ-5'-*O*-βενζούλο-3'-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (5) διαλύονται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη (0,41mmol, 206mg), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (0,1 eq, 323,6 mg, 0,28mmol), ιωδιούχο χαλκό (0,1 eq, 53,7 mg, 0,28 mmol), τριαιθυλαμίνη (3 eq, 1,2ml), και εν συνεχεία γίνεται χρήση μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 60°C. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή του προϊόντος περιλαμβάνει εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και NaHCO₃, παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄ και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης

διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **6** (138 mg), λήφθηκε υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69%.

	Προϊόν 6
TLC (Διάλυμα Γ)	R _f = 0,22
Απόδοση	69%
[α] _D ²²	-22
λ _{max}	292 nm

4.2.6 Σύνθεση της (**7**).



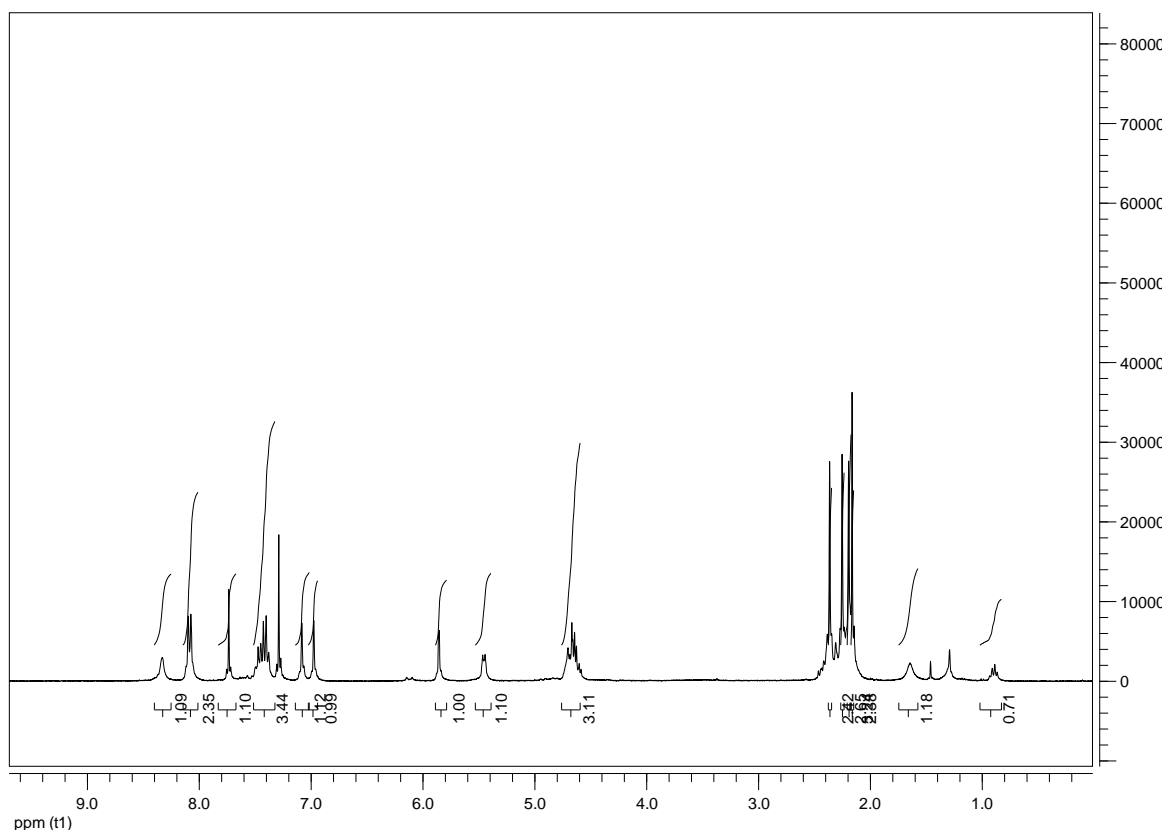
Διάλυμα του προστατευμένου νουκλεοζίτη **6** (100 mg, 0,2mmol), σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και ο αποπροστατευμένος νουκλεοζίτης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 10% μεθανόλης σε CH₂Cl₂, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7** (63,7mg), με μορφή κίτρινου ελαίου.

	Προϊόν 7
TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0,4
Απόδοση	92%
[α] _D ²²	-4
λ _{max}	292 nm

5.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ¹H-NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCEIII 300, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl₃), methanol-d₄ (CD₃OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ¹H.

Φάσμα 1H NMR του προϊόντος 6



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση ιικών μολύνσεων. Βασικός στόχος των ερευνητικών μελετών και ενεργειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φορανονονουκλεοζιτών με αντιϊκή δράση. Η πειραματική διαδικασία χαρακτηρίστηκε απλή, εύκολη, με σχετικά μικρό αριθμό βημάτων. Οι τελικές αποδόσεις που πάρθηκαν από τη σύνθεση των τελικών φορανονονουκλεοζιτών είναι ικανοποιητικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση 5-Ο-βενζουλο-1,2-Ο-ισοπροπυλιδενιο- α -D-ξυλοφουρανόζη (**2**) με απόδοση 80%, 1,2-Ο-ισοπροπυλιδένιο-5-Ο-βενζουλο-3-δεόξυ- α -D-ριβοφουρανόζη (**3**) με απόδοση 77%, 1,2-δι-Ο-ακέτυλ-5-Ο-βενζουλο-3-Ο-δεόξυ- β -D-ριβοφουρανόζη (**4**) με απόδοση 85%, 1-(2'-Ο-ακέτυλ-5'-Ο-βενζουλο-3'-Ο-δεόξυ- β -D-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (**5**) με απόδοση 69%, οι ενώσεις 6a-c με ανάλογα της (**6**) όπου R=2-F(a);2-Cl (b); 2,5-CH₃ (c) με αποδόσεις 69%, 71% και 74% αντίστοιχα και τέλος, οι ενώσεις 7a-c με ανάλογα της (**7**) όπου R=2-F(a);2-Cl (b); 2,5-CH₃ (c) με αποδόσεις 92%, 91% και 94% αντίστοιχα. Όλες οι νέες ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹HNMR.

Τα νέα μόρια **6a-c** και **7a-c** μελετήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική και αντιϊκή τους δράση έναντι του εντεροϊού Κοξάκι B4 (Coxsackie virus B4) και του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (Respiratory syncytial virus) της σειράς HeLa. Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των ιικών κυτταρικών σειρών από τους νεοσυντιθέμενους φορανονονουκλεοζίτες, απεικονίζεται στον Πίνακα 1. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τις νέες ενώσεις συγκρίνονται με αυτά του αντιϊκού φαρμάκου Ριμπαβιρίνη.

COMPOUND	IC ₅₀ ^a (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
6	22 ± 1	17 ± 1	22 ± 0
7	> 250	> 250	> 250

Πίνακας 1: Κυτταροτοξική και αντιϊκή δράση: HeLa κυταροκαλλιέργειες

Ένωση	Concentration unit	Minimum cytotoxic concentration ^a	EC ₅₀ ^b	
			Coxsackie virus B4	Respiratory syncytial virus
6	μM	100	>100	>100
7	μM	>100	>100	>100
Ribavirin	μM	>250	250	4.5

a: Η συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμη αλλαγή στη μορφολογία φυσιολογικών κυττάρων.

b: Η συγκέντρωση που απαιτείται για τη μείωση κυτταροπαθογένειας, που προκαλείται από ιούς, κατά 50%.

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 1, οι νεοσυντιθέμενοι φουρανονουκλεοζίτες παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των ιικών κυττάρων Coxsackie B4 και των κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού.

Παρατηρούμε ότι το αντιϊκό φάρμακο Ριμπαβιρίνη, αν και έχει ελάχιστη κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις πάνω από 250 μM, απαιτείται

συγκέντρωση 250 μM για μείωση της καλλιέργειας των μολυσμένων κυττάρων με Coxsackie B4 κατά 50%. Ωστόσο, απαιτείται πολύ μικρότερη συγκέντρωση (4,5 μM) για την μείωση κατά 50% καλλιέργειας κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού.

Παρατηρούμε ότι οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες **6** έχουν καλύτερη δράση έναντι των αποπροστατευμένων, λόγω αυξημένης λιποφιλικότητας. Αυτό οφείλεται στο ότι, εν γένει τα λιπόφιλα μόρια διαχέονται πιο εύκολα και γρήγορα δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, επειδή είναι λιπώδης. Αντίθετα, οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες **7** είναι λιγότερο δραστικοί σε σχέση με τους **6**, καθώς έχουν ελεύθερες υδροξυλομάδες στο μόριό τους και άρα, μειωμένη λιποφιλικότητα, αφού απαιτούνται άνω των 100 μM .

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι η δράση του μορίου **6**, με ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση στα 100 μM , είναι εξαιρετική, αφού απαιτούνται μόλις 8,9 μM της ένωσης για την μείωση κατά 50% καλλιέργειας μολυσμένων κυττάρων από Coxsackie B4 και 20 μM σε καλλιέργεια κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού.

Άρα η ριβαμπιρίνη είναι πιο αποτελεσματική για για την μείωση κατά 50% καλλιέργειας κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού σε σχέση με τις ενώσεις **6** και **7**, ενώ οι ενώσεις αυτές είναι αποτελεσματικότερες για μείωση της καλλιέργειας των κυττάρων που προσβλήθηκαν από τον ιό Coxsackie B4 κατά 50%.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.
2. Morisson & Boyd Οργανική Χημεία, τόμος ΙΙΙ Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1331, p. 758.
3. Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2001** (p) 329-351.
4. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26
5. William H. Prusoff and David C. Ward,, Commentary, Nucleoside analogs with antiviral activity, *Biochemical Pharmacology*, 1976:25, 1233-1239
6. Kaufman HE. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 109: 251-252. Medline doi:10.3181/00379727-109-27169
7. Kaufman HE, Nesburn AB, Maloney ED. IDU therapy of herpes simplex. *Arch Ophthalmol* 1962; 67: 583-591. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960020583012
8. Kaufman HE, Martola E-L, Dohlman C. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. *Arch Ophthalmol* 1962; 68: 235-239. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960030239015
9. Kaufman HE, Heidelberger C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science* 1964; 145: 585-586. Medline doi:10.1126/science.145.3632.585
10. Shigeta S, Yokota T, Iwabuchi T, et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against various strains of varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1983; 147: 576-584. Medline doi:10.1093/infdis/147.3.576

11. De Clercq E, Descamps J, De Somer P, Barr PJ, Jones AS, Walker RT. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 2947-2951. Medline doi:10.1073/pnas.76.6.2947
12. De Clercq E, Degreef H, Wildiers J, et al. Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster. *BMJ* 1980; 281: 1178 Medline doi:10.1136/bmj.281.6249.1178
13. Erik De Clercq, Review: Selective anti-herpesvirus agents, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2013; 23:93-101
14. Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C., *Handbook of Nucleoside Synthesis*, **2001**
15. Vorbruggen, H.; Hofle, G. Nucleoside Syntheses, XXIII On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. *Chem. Ber.*, **1981**, 114, 1256- 1268
16. Kiritsis C., Manta S., Papasotiriou I., Coutouli-Argyropoulou E., Trakossas S., Balzarini J. and Komiotis D., Synthesis and Biological Evaluation of 3'-C-Ethynyl and 3'-C-(1,4-disubstituted-1,2,3-triazolo) Double-Headed Pyranonucleosides, *Medicinal Chemistry*, **2012**, 8, 000-000
17. G Michael Blackburn, Michael J Gait, David Loakes, David M Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology: Edition 3*, RSC Publishing, **2006**, p.82
18. Majid M. Heravi, Sodeh Sadjadi, Recent advances in the application of the Sonogashira method in the synthesis of heterocyclic compounds, *Tetrahedron*, **2009**, 65 (37), 7761–7775
19. Jason Tierney, Pelle Lidström, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Blackwell Publishing CRC Press, **2005**, 31-32
20. Haruhiko MACHIDA, Makiko NISHITANI, Tatsuo SUZUTANI, and Kozaburo HAYASHI, Different Antiviral Potencies of BV-araU and Related Nucleoside Analogues against Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Cell Lines and Vero Cells, *Microbiol. Immunol*, Vol. 35 (11), 963-973, 1991

21. P.E. Came and L.A. Caligiuri, *Chemotherapy and Viral Infections*, Springer Science & Business Media, 2012, 98-100
22. C McGuigan, A Brancale1, H Barucki, S Srinivasan, G Jones, R Pathirana, A Carangio, S Blewett, G Luoni, O Bidet, A Jukes, C Jarvis, G Andrei, R Snoeck, E De Clercq and J Balzarini, *Review Furano pyrimidines as novel potent and selective anti-VZV agents*, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **2001**, 12, 77–89
23. Bertina B. Wentworth and EE. Russel Alexander, *Isolation of Chlamydia trachomatis by Use of 5-Iodo-2-Deoxyuridine-Treated Cells*, *Applied Microbiology*, **1974**, 27(8), 912-916
24. Komiotis D., Manta S., Tsoukala E. and Tzioumaki N., *Antiviral Unsaturated Nucleosides*, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **2008**, 7, 219-244
25. Morris J. Robins and Philip J. Barr, *Nucleic Acid Related Compounds*. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1854-1862
26. Wen Zhou, Giuseppe Gumina, Youhoon Chong, Jianing Wang, Raymond F, Schinazi, and Chung K. Chu, *Synthesiw, Structure- Activity Relationships, and Drug Resistance of 3-D-3-Fluoro-2,3-Unsaturated Nucleosides as Anti-HIV Agents*, *Med. Chem.*, 2004, 47 (13), 3399-3408
27. Vander, M. D. Sherman, Ph. D. Luciano, Ph. D. M. Tsakoulos, *Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού*.
28. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, 67, 155.
29. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 417.
30. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* 2000, 39, 12757-12765.
31. Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3154-3163

32. Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
33. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.
34. Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* **2010**, 79, 1772.
35. Balatsos, N.A.A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, 48, 6044-6051.